

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts LeA30218PCBu	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/ 02358	Internationales Anmelddatum (Tag/Monat/Jahr) 19/06/1995	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/07/1994
Internationale Patentklassifikation (IPC) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/54		
Anmelder BAYER AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 35 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfasst insgesamt sieben Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geänderte wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I Grundlage des Berichts
- II Priorität
- III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfundener Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfundener Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 05/10/1995	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 07.06.96
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter RP. Döpfer Tel. 8547 K.-P. Döpfer

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

[] der Beschreibung, Seite/n _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

[] Beschreibung: Seite _____

[] Ansprüche: Nr. _____.

[] Zeichnungen: Blatt/Abb. _____.

3. [] Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung**1. FESTSTELLUNG**

Neuheit	Ansprüche 1, 2 teilweise Ja _____ JA
	Ansprüche 1, 2 teilweise Nein _____ NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche _____ JA
	Ansprüche 1, 2 Nein _____ NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche 1, 2 Ja _____ JA
	Ansprüche _____ NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

1. Die folgenden im Recherchenbericht zitierten Dokumente werden in diesem Internationalen Vorläufigen Prüfungsbericht angegeben (D1 - D5); die Numerierung wird entsprechend der Reihenfolge im Recherchenbericht auch im weiteren Verfahren beibehalten.
2. Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 1 und 2 im Hinblick auf den in der Ausführungsordnung umschriebenen Stand der Technik (Regel 64.1 - 64.3 PCT) nicht neu ist.
In D1 (Ansprüche 2-5) werden therapeutische Mittel beansprucht, die Antagonisten oder partielle Agonisten des hIL-4 sind oder diese enthalten und hIL-4-Mutantenproteine sind und neben den Aminosäureaustauschen an den Positionen 121, 124 und/oder 125 die Möglichkeit des Abbruches der Polypeptidkette beinhalten und damit dem beanspruchten Kriterium der Modifikation am C-terminalen

Ende der Polypeptidkette genügen.

3. Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 1 und 2 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht (Regel 65.1, 65.2 PCT).

Die der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende technische Aufgabe ist dahingehend definiert, neue humane Interleukin-4-Mutantenproteine zur Verfügung zu stellen, die als Antagonisten bzw. partielle Agonisten des huma-
nen Interleukin-4 (hIL-4) wirksam sind, und zusätzlich über eine größere Stabilität verfügen, bzw. leichter zu reinigen sind.

Die o.g. technische Aufgabe wurde dadurch gelöst, dass neben Austauschen der Aminosäuren 121, 124 oder 125 in der Kette des hIL-4 zusätzliche Modifikationen am N- und/oder C-Terminus vorgenommen wurden, und/oder poten-
tielle Glykosylierungsstellen deletiert sind und/oder daß das Mutantenprotein mit einem Nicht-Protein-Polymer gekoppelt ist.

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart hIL-4-Mutantenproteine, die jeweils an den Positionen 121, 124 bzw. 125 der Polypeptidkette Aminosäureaustauschen unterworfen wurden. Dabei konnten antagonistische bzw. partiell agonistische Wir-
kungen der Muteine gegenüber hIL-4 erzielt werden (s. Beispiele 1-3 in D1). Die beschriebenen Muteine finden Verwendung als Arzneimittel.

D2 beschreibt die Wichtigkeit der Inaktivierung von N-Glykosylierungsstellen im hIL-4-Molekül, um Problemen, wie niedrigen Ausbeuten bei der Isolierung und Reinigung

oder immunogener Wirkungen von Zuckerresten enthaltenden Molekülen, aus dem Wege zu gehen. Als erfolgreich in diesem Sinne erweist sich der Austausch von Aminosäuren im hIL-4-Molekül, die potentiell für eine Glykosylierung in Frage kommen, gegen solche, die dafür aus strukturellen Gründen nicht in Frage kommen und damit die Erkennungssequenz Asn- A^1 -Z (A^1 kann jede Aminosäure sein; Z = Ser, Thr) für glykosylierende Enzyme dergestalt verändern, daß eine in-vivo-Glykosylierung nicht mehr erfolgt (siehe Seite 9, Zeile 5 bis Seite 12, Zeile 2, Ansprüche).

In D5 wird die Umwandlung von hIL-4 in einen hochaffinen Antagonisten (IL-4-Variante Y124D) durch Ersatz von Tyr-124 durch Asp beschrieben. Die Substitution von Tyr124 durch Phe, His, Asn oder Gly führt zu partiellen Agonisten mit unbeeinflusster Rezeptorbindungsaffinität. Die Bedeutung des C- bzw. N-Terminus für die räumliche Anordnung im IL-4-Molekül und damit für die biologische Aktivität (als Antagonist oder als Agonist) ist auf Seite 3241 (rechte Spalte, Zeilen 20 bis 43) erwähnt.

In D3 wird die kovalente Bindung von Nichtprotein-Polymeren (Polyethylenglykol) an rekombinantes hIL-4 zur Erhöhung der Halbwertszeit offenbart (siehe Spalte 3, Zeile 58 bis Spalte 4, Zeile 32, Beispiel 12).

D4 offenbart in Analogie zu D1 Mutationen an hIL-4, die durch Aminosäureaustausch an den Positionen Arg121, Tyr124 bzw. Ser125 zur Antagonisten bzw. partiellen Agonisten des hIL-4 führen.

Die Kombination der technischen Merkmale aus D1 und den Dokumenten D2 bzw. D5 stellt eine für den Fachmann übliche Vorgehensweise dar, um die technische Aufgabe zu lösen. Der Ersatz von Aminosäuren an den Positionen 121,

124 bzw. 125 führt zu Mutanten mit antagonistischer bzw. partiell agonistischer Aktivität gegen hIL-4. Mit der Lehre aus D5 über die Wichtigkeit des C- bzw. N-Terminus für die räumliche Struktur wird der mit der Lösung der Aufgabe befaßte Fachmann zur Modifikation der C/N-terminalen Enden der Peptidkette des mutierten hIL-4 geführt. Desgleichen gilt für die Deletion der Glykosid-Bindungsstellen (vgl. D2). Die Konjugation von Nicht-protein-Polymeren zur Erhöhung der Stabilität von rhIL-4 ist in D3 explizit offenbart und wird im Sinne der Lösung des Stabilitätsproblems vorweggenommen.

Es ist aus der vorliegenden Anmeldung nicht erkennbar, daß die hIL-4-Mutante eine antagonistische bzw. partiell agonistische Eigenschaften aufweisen, die im Sinne eines nicht vorhersehbaren Effekts erfinderische Tätigkeit implizieren würden.

4. Die Anmeldung erfüllt die Erfordernisse des Artikels 6 PCT nicht, weil der Anspruch 1 nicht klar ist. Die "Positionen 121, 124 und 125" im Anspruch 1 sind nicht eindeutig als Positionen in der Peptidkette bzw. Aminosäuresequenz der hIL-4-Mutante definiert. Der Begriff "zusätzliche Modifikationen" in Anspruch 1 steht ebenfalls im Widerspruch zu den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, da er keinerlei Rückschlüsse auf die Art der Modifikation gestattet (siehe aber Seite 6, Zeilen 28-30 der Anmeldung, die die möglichen Modifikationen als Deletion, Insertion bzw. Substitution ausweist).

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP95/02358

VIII. Bestimte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

Siehe die Anmerkungen unter Punkt V.2.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/02358

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, vol. 373, no. 9, September 1992 pages 789-790, N. KRUSE ET AL 'Mutational analysis of human interleukin-4: identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist' see abstract</p> <p>----</p>	1,2
Y	<p>EMBO JOURNAL, vol. 11, no. 9, September 1992 EYNSHAM, OXFORD GB, pages 3237-3244, N. KRUSE ET AL 'Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement' see the whole document</p> <p>-----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information to patent family members

Inte- Application No

PCT/EP 95/02358

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9310235	27-05-93	DE-A-	4137333	19-05-93
		AU-A-	2928292	15-06-93
		CA-A-	2123315	27-05-93
		CZ-A-	9401185	15-12-94
		EP-A-	0613499	07-09-94
		HU-A-	66826	30-01-95
		JP-T-	7501522	16-02-95
		NO-A-	941681	06-05-94
WO-A-8804667	30-06-88	AU-B-	620537	20-02-92
		AU-B-	1055988	15-07-88
		EP-A-	0335900	11-10-89
		JP-T-	2501827	21-06-90
US-A-5298410	29-03-94	AU-B-	660843	06-07-95
		AU-B-	4616293	01-09-94
		CA-A-	2106519	26-08-94
		CZ-A-	9400381	19-10-94
		EP-A-	0614666	14-09-94
		FI-A-	940909	26-08-94
		JP-A-	6256222	13-09-94
		NO-A-	940663	26-08-94
		NZ-A-	248590	26-07-95
		US-A-	5389381	14-02-95
		US-A-	5334382	02-08-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/EP 95/02358

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/54 A61K38/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,93 10235 (SEBALD, WALTER) 27.Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2
Y	WO,A,88 04667 (IMMUNEX CORPORATION) 30.Juni 1988 siehe Seite 9, Zeile 5 - Seite 11, Zeile 22 ---	1,2
Y	US,A,5 298 410 (C.P. PHILLIPS ET AL) 29.März 1994 siehe Spalte 3, Zeile 58 - Spalte 4, Zeile 32; Beispiel 12 ---	1,2

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrunde liegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31.Okttober 1995

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

29.11.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Le Corne, N

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
EP 95/02358

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, Bd. 373, Nr. 9, September 1992 Seiten 789-790, N. KRUSE ET AL 'Mutational analysis of human interleukin-4: identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist' siehe Zusammenfassung ---	1,2
Y	EMBO JOURNAL, Bd. 11, Nr. 9, September 1992 EYNSHAM, OXFORD GB, Seiten 3237-3244, N. KRUSE ET AL 'Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement' siehe das ganze Dokument -----	1,2

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/54, A61K 38/20		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/01274
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Januar 1996 (18.01.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02358		(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, D-51368 Leverkusen (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Juni 1995 (19.06.95)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Prioritätsdaten: P 44 23 131.8 01.07.94		DE	(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WILD, Hanno [DE/US]; 397 Longmeadow Road, Orange, CT 06477 (US); HANKO, Rudolf [DE/DE]; Schillerstrasse 23, D-40237 Düsseldorf (DE); DÖRSCHUG, Michael [DE/DE]; Buchenstrasse 5, D-42579 Heiligenhaus (DE); HÖRLEIN, Hans-Dietrich [DE/DE]; Paul-Ehrlich-Strasse 20, D-42113 Wuppertal (DE); BEUNINK, Jürgen [DE/DE]; Spitzwegstrasse 29, D-42329 Wuppertal (DE); APELER, Heiner [DE/DE]; Claudiusweg 3, D-42115 Wuppertal (DE); WEHLMANN, Hermann [DE/DE]; Mastweg 3a, D-42349 Wuppertal (DE); SEBALD, Walter [DE/DE]; Meyer-Olbersleben-Strasse 7, D-97074 Würzburg (DE).		(73) Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	

(54) Title: NEW hIL-4 MUTANT PROTEINS USED AS ANTAGONISTS OR PARTIAL AGONISTS OF HUMAN INTERLEUKIN 4

(54) Bezeichnung: NEUE hIL-4-MUTANTENPROTEINE ALS ANTAGONISTEN ODER PARTIELLE AGONISTEN DES HUMANEN INTERLEUKIN 4

(57) Abstract

The invention concerns hIL-4 mutant proteins, methods of preparing them and their use as drugs, in particular for the treatment of overshooting, dysregulated immune reactions and autoimmune diseases.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue hIL-4-Mutantenproteine, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung als Arzneimittel, insbesondere bei überschießenden fehlgesteuerten Immunreaktionen und Autoimmunerkrankungen.

In jüngster Zeit ist bereits ein monoklonaler Antikörper bekannt geworden, der gegenüber dem menschlichen Interleukin-4 antagonistische Eigenschaften aufweist. Dieser Antikörper enthält ein Fab-Fragment und wird von einer Mensch-Mensch-Hybridomazelllinie produziert. Auch eine Hybridomazelllinie aus Milzzellen einer 5 gegen (nicht-)glycosyliertes menschliches IL-4 immunisierten Ratte produziert monoklonale Antikörper gegen hIL-4.

Die Rolle des Interleukin 4 bei allergischen Prozessen läßt hoffen, daß Substanzen, die Interleukin-4 vermittelte Prozesse inhibieren oder mit dem hIL-4 konkurrieren, die krankheitsauslösende Reaktionskette unterbrechen.

10 In DE 41 37 333 A1 sind hIL-4-Mutantenproteine beschrieben, bei denen an einer oder mehreren der Positionen 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 oder 128 die dort natürlicherweise im Wildtyp auftretende(n) Aminosäure(n) gegen eine bzw. mehrere andere der möglichen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht ist. Diese hIL-4-Mutantenproteine sind Antagonisten oder partielle Agonisten des humanen 15 IL-4.

Die vorliegende Erfindung betrifft nun neue hIL-4-Mutantenproteine, die Antagonisten oder partielle Agonisten des humanen Interleukin-4 sind, in welchen zusätzlich zu dem/den Austausch/en an den Positionen 121, 124 oder 125 weitere 20 Modifikationen des hIL-4-Proteins durchgeführt worden sind. Diese Modifikationen werden durchgeführt, um die Stabilität des hIL-4-Mutantenproteins zu erhöhen, um die biologische Halbwertszeit zu verlängern oder um das Herstellungs- und Reinigungsverfahren zu erleichtern.

25 Dazu werden an einer oder mehreren Positionen, die dort natürlicherweise im Wildtyp auftretenden Aminosäuren deletiert bzw. durch andere Aminosäuren ersetzt, oder es werden zusätzliche Aminosäuren - auch an C- oder N-Terminus - eingefügt, oder eine oder mehrere der Aminosäuren werden mit verschiedenen Nicht-Protein-Polymeren, wie z.B. Polyethylenglykol und dessen Derivaten- oder durch Glycosylreste substituiert.

- 1 -

Neue hIL-4-Mutantenproteine als Antagonisten oder partielle Agonisten des humanen Interleukin 4

Die vorliegende Erfindung betrifft neue hIL-4-Mutantenproteine, Verfahren zu ihrer Herstellung, sowie ihre Verwendung als Arzneimittel, insbesondere bei überschießenden fehlgesteuerten Immunreaktionen und Autoimmunerkrankungen.

Aus der PCT WO 93/10235 sind bereits therapeutische Mittel, die Antagonisten oder partielle Agonisten des hIL-4 sind oder diese enthalten, wobei die Antagonisten oder partiellen Agonisten hIL-4-Mutantenproteine sind, bekannt.

Humanes Interleukin-4 (hIL-4) ist eines unter den zahlreichen Cytokinen, die die Proliferation, die Reifung, das Überleben und die Differenzierung lymphoider und myeloischer Zellen induzieren und koordinieren. Insbesondere ist hIL-4 an der IgE-medierten Immunreaktion beteiligt und beschleunigt direkt die Proliferation von Thymozyten und aktivierten T-Zellen. Man konnte ein hochaffines IL-4-Rezeptorprotein mit Mr 140 000 identifizieren, welches gemäß seiner cDNA-Sequenz aus 800 Aminosäureresten besteht. Dieses gehört zu einer kürzlich beschriebenen Gruppe von Rezeptoren, die man als Hämatopoietin-Rezeptor-Superfamilie bezeichnet.

Die Aminosäuresequenz des reifen IL-4 besteht aus 129 Resten, wenn man die klonierte cDNA zugrundelegt. Die cDNA ist in E.coli und Hefe exprimiert worden. Aus diesen Quellen kann rekombinantes IL-4 mit hoher biologischer Aktivität gewonnen werden.

bei welchen zusätzlich der N- und/oder C-terminus des Moleküls modifiziert ist und/oder ein oder mehrere Polyethylenglycol-Moleküle kovalent an das Molekül gebunden sind und/oder im Molekül vorhandene Glycosylierungsstellen teilweise oder vollständig deletiert sind.

5 Besonders bevorzugte Ausführungen aus dieser Gruppe sind Mutante, bei denen die Aminosäure 124 (Tyrosin), die Aminosäuren 121 (Arginin) und Aminosäure 125 (Serin) in beliebiger Kombination gegen Asparaginsäure oder Glutaminsäure ausgetauscht sind, und bei welchen zusätzlich der N- und/oder C-terminus des Moleküls modifiziert ist und/oder ein oder mehrere Polyethylenglycol-Moleküle kovalent an das Molekül gebunden sind und/oder im Molekül vorhandene Glycosylierungsstellen teilweise oder vollständig deletiert sind.

10

Bevorzugte Ausführungsform ist ebenfalls der Austausch der Aminosäure 121 (Arginin) und 125 (Serin) gegen eine natürlich vorkommende Aminosäure, bevorzugt Asparaginsäure oder Glutaminsäure, und bei welchen zusätzlich der N- und/oder C-terminus des Moleküls modifiziert ist und/oder ein oder mehrere Polyethylenglycol-Moleküle kovalent an das Molekül gebunden sind und/oder im Molekül vorhandene Glycosylierungsstellen teilweise oder vollständig deletiert sind.

15

20 Besonders bevorzugt sind weiterhin hIL-4 Mutantenproteine, in welchen die Aminosäure 124 (Tyrosin) gegen eine natürlich vorkommende Aminosäure und 0 bis eine weitere Aminosäure an den Positionen 121 und/oder 125 gegen eine andere der möglichen Aminosäuren ausgetauscht sind, und bei welchen zusätzlich der N- und/oder C-terminus des Moleküls modifiziert ist und/oder ein oder mehrere Polyethylenglycol-Moleküle kovalent an das Molekül gebunden sind und/oder im Molekül vorhandene Glycosylierungsstellen teilweise oder vollständig deletiert sind.

25

Aus dieser Gruppe besonders bevorzugt sind hIL-4 Mutantenproteine, in welchen die Aminosäure 124 (Tyrosin) gegen Asparaginsäure oder Glutaminsäure und die Position 121 gegen eine andere der möglichen Aminosäuren, bevorzugt Asparaginsäure oder Glutaminsäure ausgetauscht sind, und bei welchen zusätzlich der N- und/oder C-terminus des Moleküls modifiziert ist und/oder ein oder mehrere Polyethylenglycol-Moleküle kovalent an das Molekül gebunden sind

30

Aminosäuren stehen im Rahmen der Erfindung im allgemeinen für

Ala	L-Alanin
Arg	L-Arginin
Asn	L-Asparagin
5 Asp	L-Asparaginsäure
Cys	L-Cystein
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutaminsäure
Gly	L-Glycin
10 His	L-Histidin
Ile	L-Isoleucin
Leu	L-Leucin
Lys	L-Lysin
Met	L-Methionin
15 Pro	L-Prolin
Phe	L-Phenylalanin
Ser	L-Serin
Thr	L-Threonin
Trp	L-Tryptophan
20 Tyr	L-Tyrosin
Val	L-Valin,

wobei zur Vereinfachung die Konfigurationsbezeichnung unterbleiben kann.

Unter Nicht-Protein-Polymeren versteht man z.B. Polyethylenglycol, Polypropylenglycol oder Polyoxyalkylene, wie sie in den US-Patenten Nr. 4.640.835, 25 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 oder 4.179.337 beschrieben sind.

Unter Glycosylierung versteht man die Verknüpfung eines Kohlenhydratgerüstes an die Seitenkette eines Asparaginrestes ("N-Glycosylierung") oder die Kopplung eines Zuckers, bevorzugt N-Acetylgalaktosamin, Galaktose oder Xylose an Serin, Threonin, 4-Hydroxyprolin oder 5-Hydroxylysin (O-Glycosylierung).

30 Bevorzugt sind hIL-4 Mutantenproteine, bei denen die Aminosäure 124 (Tyrosin), die Aminosäuren 121 (Arginin) und Aminosäure 125 (Serin) in beliebiger Kombination gegen eine der möglichen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht sind, und

N. et al. (1991) FEBS Lett. 286, 58-60; Kikutani, H. et al. (1986) Cell 47, 657-665].

Zur Beschaffung von cDNA, die einen DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, oder die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, wird 5 auf Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J.E., Lee, F. and Arai, K.I. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 83, 5894-5898 und die dort angeführte Literatur verwiesen. Im vorliegenden Zusammenhang werden unter "cDNA, die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert" 10 auch cDNA's verstanden, die bei etwa gleicher Anzahl von Basenpaaren Mutanten der konkret im genannten Stand der Technik angegebenen cDNA darstellen, sofern die damit vorzusehenden hIL-4-Muteine ebenfalls Antagonisten oder partielle Agonisten sind.

Hinsichtlich der Durchnumerierung des den maturen Bereich von hIL-4 15 kodierenden DNA-Bereiches wird hier Garr. C. et al., Biochemistry 1991, 30, 1515-1523 gefolgt.

cDNA, die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, kann durch das Ausschneiden eines EcoRV/BamHI-Fragment aus einer gentechnologisch hergestellten cDNA (z.B. von Britisch Bio-Technology Ltd., Oxford, England) gewonnen werden. Das DNA-Fragment wird unter Zusatz von synthetischen Oligonucleotiden, z.B. 5'- 20 CATGCACAAGTGCGAT und 5'-ATCGCACTTGTG, welche die ersten 4 Aminosäure-Codons von Interleukin-4 und zusätzlich das Codon für das Start-Methionin enthalten, in einen Expressionsvektor integriert, beispielsweise zwischen die Ncol- und BamHI-Schnittstellen des Expressionsvektors pR^{TS}pRC 109 [vgl. Weigel, U., Meyer, M. und Sebald W. (1989) Eur. J. Biochem. 180, 295-300].

25 Aminosäuresequenz-Varianten von IL-4 werden durch Einführung geeigneter veränderter Nukleotide in die IL-4-kodierende DNA oder durch In-vitro-Synthese der gewünschten IL-4-Form erzeugt. Zu solchen Varianten gehören z.B. Deletionen oder Insertionen oder Substitutionen von Resten innerhalb der IL-4- 30 Aminosäuresequenz. Dabei ist zur Erzielung des Endkonstrukts jede Kombination aus Deletion, Insertion und Substitution zulässig, vorausgesetzt daß das Endkonstrukt die gewünschten Merkmale aufweist. Die Aminosäureveränderungen können auch die post-translationale Prozessierung von IL-4 verändern: z.B. können

und/oder im Molekül vorhandene Glycosylierungsstellen teilweise oder vollständig deletiert sind.

Bevorzugte Ausführungen der N-terminalen Modifikation für oben genannte Beispiele ist die Insertion einer Aminosäure, bevorzugt Ala, Gly, Pro, Ser, Thr, Val,
5 besonders bevorzugt Ala, zwischen dem N-terminalen Methionin und dem natürlichen N-terminus des hIL-4 Mutantenproteins.

Beispiele für ein derartig exprimiertees Produkt sind:

Ala(-1)-Tyr(124)Asp

Ala(-1)-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp

10 Ala(-1)-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp

Ala(-1)-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp

Ala(-1)-Arg(121)Asp-Ser(125)Asp

Bevorzugte Ausführung der Deletierung von Glycosylierungsstellen in den oben genannten Ausführungen sind die Austausche von Asparagin in Position 38 gegen
15 eine andere natürlich vorkommende Aminosäure, bevorzugt Asparaginsäure und/ oder Asparagin in Position 105 gegen eine andere natürlich vorkommende Aminosäure, bevorzugt Asparaginsäure.

Beispiele für derartig exprimierte Produkte sind:

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Tyr(124)Asp

20 Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Ser(125)Asp

hIL-4 lässt sich als rekombinantes Protein (rhIL-4) gentechnisch, z.B. in E.coli, erzeugen. Das dabei gebildete Protein lässt sich solubilisieren, renaturieren und isolieren. Das rhIL-4 besitzt dann eine hohe spezifische biologische Aktivität, die z.B. durch Messung der DNA-Synthese/Proliferation von aktivierten T-Zellen oder
25 der CD23 Expression von aktivierten B-Zellen bestimmt werden kann [vgl. Kruse,

Die Größe der Deletionen in einer Aminosäuresequenz beträgt in der Regel etwa 1 bis 30 Reste, bevorzugt etwa 1 bis 10 Reste, und sind im Normalfall hintereinanderliegend. Im Normalfall betreffen die Deletionen unmittelbar nebeneinander liegende Aminosäurereste.

5 Die Zahl der aufeinanderfolgenden Deletionen wird so gewählt, daß die Tertiärstruktur von IL-4 im betroffenen Bereich, z.B. Cystein-Crosslinking, Beta-Faltblatt-Struktur oder Alpha-Helix, erhalten bleibt.

Zu den Insertionen in einer Aminosäuresequenz gehören amino- und/oder carboxyl-terminale Fusionen mit einer Länge von einem einzigen Rest bis zu 10 Polypeptiden mit 100 oder mehr Resten sowie innerhalb einer Sequenz liegende Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäure-Resten. Innerhalb einer Sequenz liegende Insertionen (d.h. Insertionen innerhalb der IL-4-Sequenz) können i.a. etwa 1 bis 10 Reste, vorzugsweise 1 bis 5 und optimalerweise 1 bis 3 Reste, umfassen. Beispiele für terminale Insertionen sind IL-4 mit einem N-terminalen 15 Methionylrest, ein Artefakt der direkten Expression von IL-4 in einer rekombinanten Bakterienzellkultur, die Insertion einer oder mehrerer zusätzlicher Aminosäuren zwischen Methionin und dem natürlichen N-Terminus zur besseren Abspaltung des Methionins, z.B. durch bakterieneigene Proteasen, und die Fusion einer heterologen N-terminalen Signalsequenz an den N-Terminus des IL-4- 20 Moleküls zur Förderung der Sekretion von reifem IL-4 aus den rekombinanten Wirtszellen bzw. die Fusion von Polyaminosäuren, z.B. Polyhistidin, zur leichteren Isolierung von IL-4. Diese Signalsequenzen werden in der Regel aus den vorgesehenen Wirtszellarten ausgewählt und sind diesen daher homolog. Geeignete Sequenzen sind z.B. ompA, ompT, phoA, molE, amp oder pelB für *E. coli*-, der Alpha-Faktor, Amylase, Invertase, Killer-Toxin sowie Mellitin-Pre-Pro-Peptid für 25 Hefe- und virale Signale wie Herpes gD für Säugerzellen.

Eine weiter bevorzugte Signalsequenz ist die natürliche Signalsequenz des Interleukin-4.

30 Besonders bevorzugt sind die Signalsequenzen, die vom Expressionsorganismus selber abgespalten werden, so daß das Interleukin-4 Mutantenprotein den natürlichen N-terminus aufweist.

durch Insertion, Deletion oder anderweitige Beeinflussung der Leader-Sequenz des nativen IL-4 die Anzahl oder die Positionen der Glycosylierungsstellen, die Eigenschaften der Membranverankerung und/oder die intrazelluläre Lokalisation von IL-4 verändert werden.

5 Bei der Konstruktion von Aminosäuresequenz-Varianten von IL-4 hängen die Lokalisation der Mutationsstelle und die Art der Mutation von der (den) zu verändernden Eigenschaft(en) von IL-4 ab. Die Mutationsstellen können einzeln oder in Reihe verändert werden, so z.B. durch (1) Substitution zunächst mit konservativ ausgewählten Aminosäuren und danach mit radikaleren Wahlmöglichkeiten in Abhängigkeit von den erzielten Ergebnissen, (2) Deletion des Target-Rests oder (3) Insertion von Resten in der Nähe der lokalisierten Stelle.

10

Eine geeignete Methode zur Identifizierung bestimmter IL-4-Reste oder -Regionen als bevorzugte Mutagenesestellen ist die von Cunningham und Wells (Science, 244: 1081-1085, 1989) beschriebene "Alanin-Scanning-Mutagenese". Dabei wird 15 ein Rest oder eine Gruppe von Target-Resten identifiziert (z.B. geladene Reste wie Arg, Asp, His, Lys und Glu) und durch eine neutrale oder negativ geladene Aminosäure (am besten Alanin oder Polyalanin) ersetzt, um so die Interaktion der Aminosäuren mit dem benachbarten wässrigen Umfeld innerhalb oder außerhalb 20 der Zelle zu beeinflussen. Die Bereiche, die auf die Substitutionen funktionell empfindlich reagieren, werden danach durch die Einführung weiterer oder anderer Varianten an den oder für die Substitutionsstellen aufgearbeitet. Dies bedeutet, daß zwar die Stelle für die Einführung einer Aminosäuresequenz-Veränderung vorbestimmt ist, aber die Art der Veränderung per se nicht vorbestimmt sein muß.

Um also die Ausführung einer Mutation an einer bestimmten Stelle zu optimieren, 25 kann am Target-Codon oder an der Target-Region das Verfahren des "Alanin-Scanning" oder der Zufalls-Mutagenese durchgeführt werden, wobei die exprimierten IL-4-Varianten auf die optimale Kombination im Interesse der gewünschten Eigenschaft überprüft werden.

Bei der Konstruktion der Aminosäuresequenz-Varianten gibt es also zwei 30 Hauptvariable: die Stelle der Mutation und die Art der Mutation.

mehrerer der Kohlenhydratgerüste im nativen IL-4 und/oder Hinzufügung einer oder mehrerer Glycosylierungsstellen, die im nativen IL-4 nicht vorhanden sind.

Die Glycosylierung der Polypeptide ist normalerweise entweder N-verknüpft oder O-verknüpft. "N-verknüpft" bezieht sich auf die Kopplung des Kohlenhydratgerüsts an die Seitenkette eines Asparaginrestes. Die tri-Peptid-Sequenzen Asparagin-X-Serin und Asparagin-X-Threonin, wobei X jede Aminosäure mit Ausnahme von Prolin sein kann, sind die Erkennungssequenzen für die enzymatische Kopplung des Kohlenhydratgerüsts an die Asparagin-Seitenkette. Die Anwesenheit einer dieser tri-Peptid-Sequenzen in einem Polypeptid schafft demzufolge eine potentielle Glycosylierungsstelle.

"O-verknüpft" bezieht sich auf die Kopplung eines der Zucker N-Acetylgalactosamin, Galaktose oder Xylose an eine Hydroxyaminosäure, i.a. Serin oder Threonin, obwohl auch 4-Hydroxyprolin oder 5-Hydroxylysin verwendet werden können.

15 Die Hinzufügung von Glycosylierungsstellen an IL-4 erfolgt problemlos durch Änderung der Aminosäuresequenz derart, daß diese eine oder mehrere der oben beschriebenen tri-Peptid-Sequenzen (für N-verknüppte Glycosylierungsstellen) enthält. Die Änderung kann ebenso durch Addition oder Substitution von einem oder mehreren Serin- oder Threoninresten an die native IL-4-Sequenz (für O-verknüppte Glycosylierungsstellen) erfolgen. Im Sinne eines einfacheren Vorgehens wird die IL-4-Aminosäuresequenz vorzugsweise über Änderungen auf der Ebene der DNA geändert, insbesondere über eine Mutation der IL-4-kodierenden DNA an vorher ausgewählten Basen, so daß Codons erzeugt werden, die in die gewünschten Aminosäuren translatiert werden. Analog wird bei der gewünschten Deletion des Kohlenhydratgerüsts eine oder mehrere der vorhandenen tri-Peptid-Sequenzen (für N-verknüppte Glycosylierungen) durch Substitution oder Deletion des ganzen oder Teilen des tri-Peptids modifiziert. Im Falle von O-Glycosylierungsstellen kann das Kohlenhydratgerüst durch Substitution oder Deletion der entsprechenden Aminosäure deletiert werden.

20 30 Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Anzahl der Kohlenhydratgerüste in IL-4 liegt in der chemischen oder enzymatischen Ankopplung von Glykosiden an das Polypeptid. Diese Verfahren sind insofern von Vorteil, als daß sie die Herstellung

Bevorzugte Expressionsprodukte nach Abspaltung der Signalsequenz sind:

- Tyr(124)Asp
- Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp
- Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp
- 5 Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp
- Arg(121)Asp-Ser(125)Asp

Zu den weiteren Insertions-Varianten von IL-4 gehören die Fusion immunogener Polypeptide an den N- oder C-Terminus von IL-4, z.B. bakterielle Polypeptide wie Beta-Lactamase oder ein durch den E. coli-trp-Locus kodiertes Enzym oder ein 10 Hefeprotein, sowie C-terminale Fusionen mit Proteinen mit langer Halbwertzeit wie z.B. immunglobulinkonstante Regionen (oder andere Immunglobulin-Regionen), Albumin oder Ferritin - vgl. Beschreibung in WO 89/02922 (veröffentlicht am 6. April 1989).

Eine weitere Gruppe von Varianten sind diejenigen mit Aminosäuresubstitution. 15 Bei diesen Varianten ist mindestens ein Aminosäurerest im IL-4-Molekül durch einen anderen Rest ersetzt.

Die natürlich vorkommenden Reste werden auf der Grundlage gemeinsamer Seitenketten-Charakteristika in Klassen gegliedert:

- 1) hydrophob: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 20 2) neutral hydrophil: Cys, Ser, Thr;
- 3) sauer: Asp, Glu;
- 4) basisch: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) Reste mit Einfluß auf die Kettenorientierung: Gly, Pro; und
- 25 6) aromatisch: Trp, Tyr, Phe.

Nichtkonservative Substitutionen beinhalten den Austausch eines Vertreters einer dieser Klassen gegen den einer anderen.

Die Aminosäuresubstitution findet u.a. Anwendung bei der Änderung des nativen Glycosylierungsmusters des Polypeptids. "Änderung" heißt Deletion eines oder

Das zur Quervernetzung verwendete Agens, der Substitutionsgrad und die Reaktionsbedingungen wird durch Experimente mit bifunktionellen Agentien ausgewählt, vorzugsweise mit einer Reihe von Reagenzien, von denen jedes mit einer anderen Seitenkette reagiert.

5 Eine bevorzugt genutzte Möglichkeit zur Verbesserung der Halbwertzeit von in vivo zirkulierenden Proteinen ist dessen Konjugation an ein Polymer, das ihm eine längere Halbwertzeit verleiht. So hat sich z.B. die Konjugation von Polyethylenglykol (PEG) an C1-NH als eine ausgezeichnete Möglichkeit zur Verlängerung der Halbwertzeit erwiesen. PEG ist ein nicht immunogenes, lineares, 10 ungeladenes Polymer mit drei Wassermolekülen pro Molekül Äthylenglykol, so daß sich die hydrodynamischen Eigenschaften der konjugierten Moleküle dramatisch ändern können (Maxfield et al., Polymer, 16:505-509 (1975); Bailey, F.E., et al, in: Nonionic surfactants [Schick, M.J., Hrsg.] S. 794-821, 1967). Mehrere therapeutisch verwendete Enzyme wurden mit dem Ziel einer wirksamen Erhöhung 15 der In-vivo-Halbwertzeit mit PEG verknüpft (Abuchowski, A. et al., J. Biol. Chem. 252:3582-3586, 1977; Abuchowski, A. et al., Cancer Biochem. Biophys., 7:175-186, 1984). Die PEG-Verknüpfung von IL-2 (Interleukin-2) soll nicht nur dessen Zirkulations-Überlebensdauer verlängern, sondern auch dessen Potenz erhöhen (Katre, N.V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:1487-1491 (1987); Goodson, 20 R. et al., Bio/Technology, 8:343-346, 1990). Für die PEG-Verknüpfung anderer Moleküle ist eine Verminderung der Immunogenität und der Toxizität mitgeteilt 25 worden (Abuchowski, A. et al., J. Biol. Chem., 252:3578-3581, 1977).

IL-4 kann auch in Mikrokapseln eingeschlossen werden, hergestellt z.B. durch Coacervationstechniken oder durch "Grenzschicht-Polymerisierung" ("interfacial polymerization") (z.B. Hydroxymethylcellulose- oder Gelatine-Mikrokapseln und Poly-[Methylmethacrylat]-Mikrokapseln) in kolloidalen Arzneistoff-Freigabesystemen (z.B. Liposome, Albumin-Mikrosphären, Mikroemulsionen, Nano-Partikel und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen. Solche Techniken werden in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, Osol, A., Hrsg. (1980), 30 genannt.

IL-4-Präparate sind auch bei der Antikörpergewinnung als Standards für IL-4-Assays (z.B. durch Markierung von IL-4 zur Verwendung als Standard in einem Radioimmunassay, einem enzymgekoppelten Immunassay oder in einem

des Polypeptids nicht in einer Wirtszelle mit Glykosylierungsmöglichkeiten für die N- und O-verknüpfte Glykosylierung erfordern. Je nach dem verwendeten Kopplungsmechanismus kann (können) der (die) Zucker mit (a) Arginin und Histidin, (b) freien Carboxylgruppen, (c) freien Sulfhydrylgruppen wie denen von 5 Cystein, (d) freien Hydroxylgruppen wie denen von Serin, Threonin oder Hydroxyprolin, (e) aromatischen Resten wie denen von Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan oder (f) der Amidogruppe von Glutamin verknüpft werden. Diese Methoden werden in WO 87/05330, veröffentlicht am 11. September 1987, und bei Aplin und Wriston (CRC Crit. Rev. Biochem., S. 259-306 [1981]) beschrieben.

10 Zur Entfernung der im nativen IL-4 vorkommenden Kohlenhydratgerüste können neben der oben erwähnten Methode auch chemische oder enzymatische Mittel angewandt werden. Bei der chemischen Deglykosylierung ist die Exposition des Polypeptids gegenüber der Verbindung Trifluormethansulfonsäure oder einer äquivalenten Verbindung erforderlich. Diese Behandlung führt zur Abspaltung der 15 meisten oder aller Zucker mit Ausnahme des verknüpfenden Zuckers (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalaktosamin), lässt aber das Polypeptid intakt. Die chemische Deglykosylierung wird von Hakkimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) und von Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981) beschrieben. Die enzymatische Abspaltung von Kohlenhydratgerüsten in den 20 Polypeptiden ist durch die Verwendung einer Reihe von Endo- und Exoglykosidasen - beschrieben von Thotakura et al. (Meth. Enzymol., 138:350 [1987]) - zu erreichen.

Die Glykosylierung an den potentiellen Glykosylierungsstellen kann durch 25 Verwendung der Verbindung Tunicamycin - beschrieben von Duskin et al. (J. Biol. Chem., 257:3105 [1982]) - verhindert werden. Tunicamycin blockiert die Bildung von Protein-N-Glykosid-Verknüpfungen.

Ein weiterer Typ einer kovalenten Modifikation von IL-4 schließt die Verknüpfung 30 von IL-4 an verschiedene Nicht-Protein-Polymer, z.B. Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylene, in der Art und Weise ein, wie sie in den US-Patenten Nr. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 oder 4,179,337 beschrieben wird.

THERAPEUTISCHE FORMULIERUNGEN UND VERABREICHUNG VON IL-4

Die erfundungsgemäßen Verbindungen inhibieren entweder Interleukin-4-vermittelte Prozesse oder konkurrieren mit dem hIL-4. Sie eignen sich deshalb zur Behandlung von überschießenden bzw. fehlgesteuerten Immunreaktionen und Autoimmunerkrankungen. Dazu zählen auch Immundefizienzen sowohl primärer als auch sekundärer Art. Darüber hinaus kann der Antagonist sowohl bei Transplantationen als auch bei der palliativen Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Dazu gehören beispielsweise:

- 10 - Allergien
(Blockierung der Primär- und der IgE vermittelten Antwort; Desensibilisierung bei bekannter Allergie; Atopische Erkrankungen; Linderung bei Asthma Anfällen; Hyper IgE Syndrom).
- 15 - Transplantationen
(Reduktion der HLA-DR Expression bei Organtransplantation, Suppression der GVHD, Einsatz beim Purgen von Knochenmark)
- 20 - Leukämien und solide IL-4 Rezeptor exprimierende Tumoren
(Reduktion einer überschießenden autokrinen IL-4 Produktion; Hemmung des Tumorwachstums)
- 25 - Gegenregulation bei Überproduktion von Thrombozyten
- Therapie von Gerinnungsstörungen
(via Monozytenblock)
- 30 - Verwendung bei Störungen des Lipidstoffwechsels
- Korrektur bei Störungen des Kohlehydrathaushalts
- Verbesserung des Immunstatus bei Infektionen
(Sepsis).

Aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit kann das IL-4-Mutantenprotein sowohl systemisch als auch lokal d.h. topisch eingesetzt werden, u.a. inhalativ als Spray. Auch eine Formulierung als Depotpräparat ist möglich. Bei allen Therapieformen ist sowohl an eine Kurzzeittherapie als auch an eine Dauertherapie zu denken.

Radiorezeptorassay), in Affinitäts-Reinigungstechniken und in Rezeptorbindungs-Assays (vom kompetitiven Typ) bei Markierung mit Radioiod, Enzymen, Fluorophoren, "spin labels" usw. geeignet.

Da die Voraussage der Eigenschaften einer IL-4-Variante schwierig ist, ist es 5 verständlich, daß ein gewisses "Screening" der erhaltenen Variante notwendig ist, um die optimale Variante zu erreichen. So wird z.B. eine Änderung im immunologischen Charakter des IL-4-Moleküls, z.B. die Affinität für einen bestimmten Antikörper, durch einen kompetitiven Immunassay gemessen. Die Variante wird auf Veränderungen bei der Verminderung oder Verstärkung ihrer 10 Aktivität - verglichen mit der im gleichen Assay für das nativen IL-4 festgestellten Aktivität - überprüft. Andere potentielle Veränderungen der Protein- oder Polypeptid-Eigenschaften - wie z.B. der Redox- oder der thermischen Stabilität, der Hydrophobizität, der Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau, der Stabilität in der rekombinanten Zellkultur oder im Plasma oder auch der Tendenz, 15 mit "Carriern" oder zu Multimeren zu aggregieren - werden durch Methoden bestimmt, die Stand der Technik sind.

kürzere Zeiträume. Verweilen gekapselte Proteine über längere Zeiträume im Körper, so können sie durch Feuchtigkeit bei 37 °C denaturieren oder aggregieren, woraus sich ein Verlust an biologischer Wirksamkeit und mögliche Veränderungen in der Immunogenität ergeben. Zur Stabilisierung der Proteine lassen sich je nach 5 dem in Frage kommenden Mechanismus sinnvolle Strategien entwickeln. Stellt sich z.B. heraus, daß der Mechanismus, der zur Aggregation führt, auf einer intermolekularen S-S-Brückenbildung durch Thiodisulfid-Austausch beruht, läßt sich die Stabilisierung durch Modifizierung der Sulphydrylreste, Lyophilisierung aus sauren Lösungen, Kontrolle des Flüssigkeitsgehaltes, Verwendung geeigneter 10 Zusatzstoffe und Entwicklung spezieller Polymer-Matrix-Zusammensetzungen erreichen.

Zu den Formulierungen eines IL-4-Antagonisten mit verzögerter Freisetzung gehören ebenso in Liposomen eingeschlossene IL-4-Antagonisten. IL-4-Antagonisten enthaltende Liposome werden mit per se bekannten Methoden 15 hergestellt: DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; japanische Patentanmeldung 83-118008; US-Pat. Nr. 4,485,045 und 4,544,545; sowie EP 102,324. Die Liposome sind in der Regel vom kleinen (etwa 200-800 Angström) 20 unilamellaren Typ mit einem Lipidgehalt von mehr als etwa 30 Mol-% Cholesterin, wobei der Anteil für die optimale IL-4-Antagonisten jeweils angepaßt wird. Liposome mit einer verlängerten Zirkulationszeit werden im US-Pat. Nr. 5,013,556 offengelegt.

Eine weitere Anwendung der Erfindung betrifft den Einbau von IL-4-Antagonisten 25 in "geformte Artikel". Diese können zur Modulierung oder Verhinderung des Auftretens eines Schocks eingesetzt werden.

Therapeutische Formulierungen des IL-4-Antagonisten werden zur Lagerung dadurch zubereitet, daß der IL-4-Antagonist nach Erreichen des gewünschten Reinheitsgrades mit physiologisch akzeptablen "Carriern", Hilfsstoffen oder Stabilisatoren (Remington's Pharmaceutical Sciences, a.a.o.) in Form eines Lyophilisats oder von wässrigen Lösungen gemischt wird. Akzeptable "Carrier", Hilfsstoffe oder Stabilisatoren sind für die Empfänger bei den angewendeten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch; dazu gehören Puffer wie Phosphat, Zitrat und andere organische Säuren; Antioxidantien wie z.B. Ascorbinsäure; niedermolekulare Polypeptide (weniger als etwa 10 Reste), Proteine wie Serumalbumin, Gelatin oder Immunglobuline; hydrophile Polymere wie Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren wie Glycin, Glutamin, Asparagin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate, z.B. Glukose, Mannose oder Dextrine; Chelatbildner wie EDTA; Zuckeralkohole wie Mannitol oder Sorbitol; salzbildende Gegenionen wie Natrium und/oder nicht-ionische oberflächenaktive Stoffe wie Tween, Pluronics oder Polyethylenglykol (PEG).

Ein IL-4-Antagonist zur in-vivo-Anwendung muß steril sein. Dies wird leicht erreicht durch Filtration über sterile Membranfilter, entweder vor oder nach der Lyophilisierung und Rekonstitution. Gelagert wird der IL-4-Antagonist normalerweise in lyophilisierter Form oder in Lösung.

Geeignete Beispiele für Zubereitungen mit verzögerter Freisetzung sind z.B. semipermeable Matrizen aus festen hydrophoben Polymeren, die das Protein enthalten; bei diesen Matrizen handelt es sich um geformte Artikel ("shaped articles"), z.B. Filmtabletten oder Mikrokapseln. Beispiele für Matrizen mit verzögerter Freisetzung sind Polyester, Hydrogele [z.B. Poly(2-hydroxyethyl-methacrylat) - beschrieben von Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 [1981] und Langer, Chem. Tech., 12:98-105 [1982] -oder Poly(vinylalkohol)], Polyactide (US-Pat. Nr. 3,773,919, EP 58,481), Copolymere aus L-Glutaminsäure und Gamma-ethyl-L-glutamat (Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 [1983]), nicht abbaubares Ethylen-vinyl-acetat (Langer et al., a.a.o.), abbaubare Milchsäure-Glykolsäure-Copolymere wie Lupron DepotTM (injizierbare Mikrosphären aus Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer und Leuprolidazetat) und Poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure (EP 133,988). Während Polymere wie Ethylenvinylacetat und Milchsäure-Glykolsäure die Freisetzung der Moleküle über mehr als 100 Tage ermöglichen, erfolgt die Freisetzung der Proteine bei einigen Hydrogelen über

Beispiel 2**Insertion einer Aminosäure in der Position (+ 2) zur Herstellung eines IL-4 Muteins ohne N-terminalem Methionin in E. coli**

Zur Herstellung eines IL-4-Muteins, dem das N-terminale Methionin fehlt, wurde 5 in der Position (+ 2) eine Aminosäure eingeführt, die zur Abspaltung des N-terminalen Methionins in E. coli durch eine spezifische Methionin Aminopeptidase führt (Flinta et al., Eur. J. Biochem. 154, 193 - 196, 1986). Zu diesem Zweck wurde der Vektor RPR9-IL4-Y 124D (Anlage 1) mit den Restriktionsendonucleasen XhoI und BamHI geschnitten. Das hierbei entstehende ca. 450 Bp lange 10 DNA Fragment, das die Sequenzinformationen für das IL4Y124D Gen und ein kurzes (ca. 50 Bp langes) Fragment aus der atpE Region des Vektors trägt, wurde über Agarosegelektrophorese gereinigt und in den mit Sall und BamHI geschnittenen Vektor M13mp18 umkloniert. Einzelsträngige DNA wurde hergestellt und einer 'in vitro Mutagenese Reaktion' mit folgendem Oligonukleotid 15 unterzogen:

5' CTGGAGACTGCCATGGCCCACAAGTGCGATATCACC 3'.

Durch diese Mutagenese wird in der Position (+ 2) des IL4Y124D Gens die Aminosäure Alanin (Codon GCC) eingefügt. Außerdem wird am 5'-Ende des Gens 20 eine NcoI Schnittstelle (CCATGG) eingeführt, um das anschließende Screening und die Klonierung in einem Expressionsvektor zu erleichtern. Das 'Screening' der Plaques erfolgte durch eine Restriktionsanalyse ausgehend von doppelsträngiger M13 RF DNA (Replikative Form). Positive Klone konnten durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen NcoI und BamHI identifiziert werden. Die korrekte Sequenz wurde zusätzlich durch eine Sequenzierung bestätigt.

25 Ein ca. 400 Bp langes DNA Fragment wurde mit NcoI und BamHI aus einem ausgewählten M13mp18 Klon herausgeschnitten, über Agarosegelektrophorese gereinigt und in den ebenfalls mit NcoI und BamHI geschnittenen Vektor pTrc99A (kommerziell erhältlich von Pharmacia P-L Biochemicals) kloniert. Mit dem aus dieser Klonierung resultierenden Vektor pAPH100 (IL4Y125D) wurden E. coli 30 Zellen (TG1) transformiert und auf Ampicillin-haltigem Nährboden selektioniert.

Beispiel 1**Entfernung potentieller N-Glykosilierungsstellen in hIL-4-Mutantenproteinen**

In der natürlichen hIL-4-Aminosäuresequenz sind zwei Asparagin-gekoppelte Glykosylierungsstellen in den Aminosäure-Positionen 38 und 105 vorhanden. Die 5 entsprechenden Codons im Strukturgen können gegen solche für Asparaginsäure ausgetauscht werden. Dadurch unterbleibt bei Expression des Gens in Hefestämmen eine N-Glykosylierung des resultierenden hIL-4-Mutantenproteins.

Die Durchführung der beiden Codon-Austausche ("site-directed mutagenesis") im Strukturgen für hIL-4-Mutantenproteine erfolgte nach der Methode von Deng und 10 Nickoloff [Anal. Biochem. 200:81 (1992)] unter Verwendung des Klonierungs-Vektors pUC18. Die synthetischen Oligonucleotide, die für die Änderung des Strukturgen erforderlich waren, hatten folgende Sequenzen:

- a) für den Austausch Asparagin gegen Asparaginsäure in Position 38:
5' - GCC TCC AAG GAC ACA ACT GAG -3'

- 15 b) für den Austausch Asparagin gegen Asparaginsäure in Position 105:
5' - GTG AAG GAA GCC GAC CAG AGT ACG -3'.

Die in den angegebenen Nukleotidsequenzen unterstrichenen Positionen markieren die Codons für Asparaginsäure.

20 Durch DNA-Sequenzierung wurde der Codon-Austausch in der Nukleotidsequenz bestätigt. Das geänderte Strukturgen wurde in Hefe-Expressionsvektoren inseriert und in geeigneten Stämmen zur Expression gebracht.

Stammkonserven:

Stammkonserven aller Hefetransformanten wurden durch Abfüllung von 2-ml-Aliquots einer Vorkultur und Lagerung in flüssigem Stickstoff angelegt.

Vorkulturen:

5 Die Vorkulturfermentationen wurden in 1-Ltr.-Schüttelkolben, gefüllt mit 200 ml SD2-Nährösung durchgeführt. Die Beimpfung erfolgte mit einer Stammkonserven oder mit einer Einzelkolonie von einer SD2-Agarplatte. Die Kulturen wurden unter ständigem Schütteln für 2-3 Tage bei 26-30°C inkubiert.

Hauptkulturfermentationen:

10 Die Hauptkulturfermentationen wurden unter Verwendung von 10-Ltr.-Rührkesselfermentern in Sc6-Nährösung durchgeführt. Die Beimpfung erfolgte mit 3-5 Vol% einer Vorkultur, wobei vor der Beimpfung die Biomasse aus der Vorkultur abzentrifugiert und in Sc6-Medium resuspendiert wurde. Die Fermentationsbedingungen für die 10-Ltr.-Hauptkultur waren wie folgt:

15 Temperatur 26-30°C
Rührerdrehzahl 600 rpm
Belüfungsrate 0,5 vvm
pH-Sollwert 5,5 (Korrektur mit 5 N NaOH und 5 N H₂SO₄)

20 Ab einer Fermentationszeit von 5 Std. wurden die Kulturen kontinuierlich mit Glucose und Hefeextrakt gefüttert. Die Fütterungsrate wurde über den Respiratorischen Quotienten (RQ-Wert) der Kultur geregelt. Der RQ-Sollwert betrug 1,0. Die Fütterlösung hatte folgende Zusammensetzung:

Glucose 500 g/l
Difco-Hefeextrakt 75 g/l

25 Die Bestandteile wurden getrennt, in demineralisiertem Wasser gelöst und für 20 min bei 121°C sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurden beide Lösungen vereinigt.

Die Expression und Reinigung des Proteins führte zu einem IL-4 Mutein, dem das N-terminale Methionin fehlt.

Beispiel 3:

Fermentation der Hefezellen

5 **Nährlösungen:**

Zur Kultivierung der hIL4-Mutantenproteine exprimierenden Hefezellen wurden die folgenden Nährlösungen verwendet:

		Nährlösung	
Einsatzstoff		SD2	Sc6
	Bacto Yeast Nitrogen Base	6,7 g/l	-
10	Difco Hefeextrakt	-	20,0 g/l
	Glucose	20,0 g/l	5,0 g/l
	KH ₂ PO ₄	6,7 g/l	1,4 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	2,0 g/l
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	-	0,5 g/l
15	Antischaummittel PPG 2000	-	0,1 g/l

Die Einsatzstoffe wurden in demineralisiertem Wasser angesetzt und der pH-Wert auf pH 5,5 eingestellt. Die Sterilisation erfolgte für 20 min bei 121°C. Glucose wurde in 1/5 des erforderlichen Volumens in demineralisiertem Wasser gelöst, getrennt sterilisiert und nach dem Abkühlen zur übrigen Nährlösung gegeben.

Beispiel 4**Fermentation von E. coli**Nährlösungen:

5 Die Kultivierung der hIL4-Mutantenproteine exprimierenden E.coli-Transformanten erfolgte in LB-Nährlösung folgender Zusammensetzung:

Bacto Tryton	10 g/l
Bacto Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

10 Die Bestandteile wurden in deionisiertem Wasser gelöst und für 20 min bei 121°C sterilisiert. Vor der Beimpfung wurde der Nährlösung ein zur Selektion der Transformanten geeignetes Antibiotikum (z.B. 100 mg/l Na-Ampicillin oder 50 mg/l Kanamycinsulfat in Abhängigkeit von dem im Vektor verwendeten Selektionsmarker) steril zugefügt.

Stammkonserven:

15 Stammkonserven aller E. coli-Transformanten wurden durch Abfüllung von 2 ml-Aliquots einer Vorkultur und Lagerung in flüssigem Stickstoff angelegt.

Vorkulturen:

20 Die Vorkulturfermentationen wurden in 1 Ltr-Schüttelkolben, gefüllt mit 200 ml LB-Nährlösung durchgeführt. Die Beimpfung erfolgte mit einer Stammkonserven oder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte. Die Kulturen wurden unter ständigem Schütteln für 12 - 18 Std. bei 30°C inkubiert.

Hauptkulturfermentationen:

25 Die Hauptkulturfermentationen wurden unter Verwendung von 10 Ltr.-Rührkesselfermentern in LB-Nährlösung durchgeführt. Die Beimpfung erfolgte mit 1-5 Vol% einer Vorkultur, wobei vor der Beimpfung die Biomasse aus der

Bei Verwendung des induzierten Gal10-Promotors oder eines Derivats des Gal10-Promotors erfolgte die Induktion durch Wechsel des Kohlenhydrats in der Futterlösung von Glucose (500 g/l) zu Galaktose (500 g/l). Die weitere Kontrolle der Fütterungsrate erfolgte dann nicht über den RQ-Wert. Die Fütterungsrate wurde manuell auf den doppelten Wert der Fütterungsrate zum Zeitpunkt der Induktion eingestellt. Die Induktion des Gal10-Promotors erfolgte üblicherweise nach etwa 48 Std. Fermentationsdauer.

Zellernte:

Nach Beendigung der Fermentation (80-120 Std.) wurde der Fermenterinhalt auf 10 10-15°C abgekühlt und im Falle der intrazellulären Expression die Hefezellen durch Standard-Zentrifugationstechniken (z.B. Becherzentrifuge) geerntet. Die nach der Zentrifugation erhaltene Zellmasse wurde durch direktes Eintropfen in flüssigen Stickstoff cryopelletisiert und bei -80°C gelagert. Die Produktaufarbeitung erfolgte aus der so behandelten Biomasse. Bei Sekretion des heterologen 15 Proteins in die Kulturbrühe erfolgte eine Abtrennung der Hefezellen aus der Kulturbrühe durch Standard-Zentrifugationstechniken (z.B. Becherzentrifuge) oder mittels Querstrom-Mikrofiltration (z.B. Filtron-Minisette-System). Falls erforderlich wurde die Kulturbrühe sterilfiltriert. Die weitere Produktaufarbeitung erfolgte aus der zellfreien Kulturbrühe.

Beispiel 5**Expression von Interleukin -4-Mutantenproteinen in Hefezellen unter Verwendung konstitutiver Promotoren**

Hefetransformanten mit einem Expressionsvektor enthaltend ein für ein hIL-4-Mutantenprotein kodierendes Gen und einen konstitutiven Promotor (z.B. Alpha-Mating-Faktor-Promotor, GAPDH-Promotor, TPI-Promotor) wurden im 10 Ltr.-Maßstab bei 28°C kultiviert. Während der Fermentation erfolgte die qualitative Prüfung auf Expression des hIL-4-Mutantenproteins mittels SDS-PAGE. Die Fermentationsdauer betrug 96 Std. Die bei Fermentationsende erzielte Biomassekonzentration lag bei 27 g/l TG. Nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation (15 min, 6.500 x g, 4°C) und Sterilfiltration erfolgte die Produktaufarbeitung aus der zellfreien Kulturbrühe.

Beispiel 6**Expression von Interleukin-4-Mutantenproteinen in Hefezellen unter Verwendung induzierbarer Promotoren**

Hefetransformanten mit einem Expressionsvektor enthaltend ein für ein hIL-4-Mutantenprotein kodierendes Gen und einen induzierbaren Promotor (z.B. Gal10-Promotor oder ein Derivat des Gal10-Promotors) wurden im 10 Ltr. Maßstab bei 28°C kultiviert. Nach einer Fermentationsdauer von 48 Std. erfolgte die Induktion durch Wechsel des in der Futterlösung verwendeten Kohlenhydrats von Glucose nach Galaktose. Während der Fermentation erfolgte die qualitative Prüfung auf Expression des hIL-4-Mutantenproteins mittels SDS-PAGE. Die Fermentationsdauer betrug 96 Std. Die bei Fermentationsende erzielte Biomassekonzentration betrug 24 g/l TG. Nach Abtrennung der Zellen und Sterilfiltration erfolgte die Produktaufarbeitung aus der zellfreien Kulturbrühe.

Analog zu diesem Verfahren können auch andere induzierbare Promotoren zur Expression von hIL-4-Mutantenproteinen eingesetzt werden. In Abhängigkeit von der Art des gewählten Promotors muß eine geeignete Induktionstechnik eingesetzt werden.

Vorkultur abzentrifugiert und in frischem LB-Medium resuspendiert wurde. Die Fermentationsbedingungen für die 10 Ltr.-Hauptkultur waren wie folgt:

	Start-Temperatur	30°C (bei Verwendung temperaturinduzierbarer Promotoren)
5		37°C (bei Verwendung IPTG-induzierbarer Vektoren)
	Rührerdrehzahl	500 rpm
	Belüftungsrate	0,5 vvm

Zur Verfolgung des Biomassenwachstums wurden im Abstand von ca. 1 Std. aus der Kulturbrühe sterile Proben entnommen und die optische Dichte bei 600 nm (OD600) bestimmt. Bei Erreichen einer OD600 von 0,8 - 1,2 erfolgte die Induktion der Kulturen. In Abhängigkeit vom gewählten Promotor wurde wie folgt induziert:

	Temperaturinduktion:	Erhöhung der Fermentationstemperatur von 30°C auf 42°C
15	IPTG-Induktion:	Sterile Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ad 0,4 mM

Die Induktionszeit betrug typischerweise 4 - 8 Std.

Zellernte:

Nach Beendigung der Fermentation (6 - 14 Std.) wurde der Fermenterinhalt auf 20 10-15°C abgekühlt und die Bakterienzellen durch Standard-Zentrifugations-techniken (z.B. Becherzentrifuge) geerntet. Die nach der Zentrifugation erhaltene Zellmasse wurde gegebenenfalls im eingefrorenen Zustand zwischengelagert. Die Produktaufarbeitung erfolgte aus der so gewonnenen Biomasse.

das Produkt enthaltenden "inclusion bodies" wurden mittels Zentrifugation (35.000 x g, 20 min.) gewonnen und im Aufschlußpuffer, der zusätzlich 4 M Harnstoff enthielt, gewaschen.

Solubilisierung und Sulfitolyse des Produkts

5 Die gewaschenen "inclusion bodies" wurden in 125 ml Puffer (0,2 M Tris, pH 8,1, 8 M Guanidinhydrochlorid) solubilisiert. 4 g Natriumsulfit und 2 g Kaliumtetra-thionat wurden zugegeben, und die Reaktionsmischung 2 h gerührt. Ungelöste Bestandteile wurden nach Beendigung der Reaktion durch Zentrifugation entfernt (35.000 x g, 20 min.).

10 Gelfiltration

Der Überstand wurde auf eine Gelfiltrationssäule (Sephacryl-S-300 HR, Pharmacia, 10 x 90 cm) aufgetragen und in PBS-Puffer, der 6 M Guanidinhydrochlorid enthielt, mit einer Flußrate von 280 ml/h gelfiltriert. Produkthaltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereinigt.

15 Renaturierung

Zur Reduktion der Moleküle wurde β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 15 mM) hinzugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 5fach mit Wasser verdünnt und 3-4 Tage gegen Puffer (3 mM NaH_2PO_4 , 7 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KCl, 120 mM NaCl) dialysiert.

20 Konzentrierung

Das dialysierte Material wurde mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt und die Leitfähigkeit durch Zugabe von Wasser auf $\leq 10 \text{ mS/cm}$ verringert. 50 ml CM-Sepharose-FF (Pharmacia), equilibriert mit 25 mM Ammoniumacetat, pH 5,0, wurden unter Rühren zum Ansatz gegeben. Ungebundenes Material wurde abfiltriert, und das Gel in eine Säule gefüllt. Das Produkt wurde mit einem linearen Gradienten von 0-1 M NaCl in 25 mM Ammoniumacetat, pH 5,0, mit einer Flußrate von 300 ml/h eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE oder analytischer RP-Chromatographie identifiziert.

Beispiel 7**Expression von Interleukin-4-Mutantenproteinen in E. coli unter Verwendung induzierbarer Promotoren**

E.coli-Transformanten mit einem Expressionsvektor enthaltend ein für ein hIL-4-Mutantenprotein kodierendes Gen und einen temperaturinduzierbaren Promotor (z.B. λ pL-Promotor oder ein Derivat des λ pL-Promotors) wurden im 10 Ltr. Maßstab in LB-Nährlösung kultiviert. Die Selektion der vektorhaltigen Zellen erfolgte durch Zufüge von 100 mg/l Na-Ampicillin zur LB-Nährlösung (= LB+Amp-Nährlösung). Die Beimpfung der Hauptkulturansätze erfolgte mit 5 Vol% einer 14 Std. alten in LB+Amp-Nährlösung kultivierten Vorkultur. Die Fermentationstemperatur betrug bei Beginn der Fermentation 30°C und wurde zur Induktion des temperatursensitiven Promotors nach Erreichen einer OD600 von 0,8 - 1,2 auf 42°C erhöht. Während der Fermentation erfolgte die qualitative Prüfung auf Expression des hIL-4-Mutantenproteins mittels SDS-PAGE. Nach einer Induktionsdauer von 4 - 6 Std. erfolgte die Beendigung der Fermentation durch Kühlung der Kulturbrühe auf 10-15°C. Die bei Fermentationsende erzielte Biomassekonzentration betrug ca. 5 g/l FG. Die E. coli-Zellen wurden durch Zentrifugation in der Becherzentrifuge geerntet (15 min., 6500 x g, 4°C) und die Zellmasse durch direktes Eintropfen in flüssigen Stickstoff cryopelletisiert. Die weitere Lagerung der so tiefgefrorenen Biomasse erfolgte bei -80°C. Die Produktaufarbeitung erfolgte aus der so behandelten Biomasse.

Analog zu diesem Verfahren können auch andere induzierbare Promotoren zur Expression von hIL-4-Mutantenproteinen in E. coli eingesetzt werden. In Abhängigkeit von der Art des gewählten Promotors muß eine geeignete Induktionstechnik verwendet werden.

Beispiel 8**Aufarbeitung eines IL-4-Mutantenproteins****Zellaufschluß und Isolierung der "inclusion bodies"**

25 g E. coli Feuchtmasse aus Beispiel 7 wurden in 200 ml Puffer (0.1 M Phosphatpuffer, pH 7,3, 0.1% Triton, 1 mM EDTA, 1 μ g/ml Pepstatin) aufgenommen und durch Ultraschall (Branson Sonifier B 15) aufgeschlossen. Die

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Bayer AG
- (B) STRASSE: Bayerwerk
- (C) ORT: Leverkusen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-51368
- (G) TELEPHON: 0214/3061455
- (H) TELEFAX: 0214/303482

(ii) ANMELDETITEL: Neue hIL4-Mutantenproteine als Antagonisten oder partielle Agonisten des humanen Interleukin 4

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARÄKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (C) INDIVIDUUM ISOLAT: synthetisch

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Endreinigung

Der Pool der CM-Sepharose wurde auf eine mit 0,1% TFA equilibrierten Vydac C-4 Säule (1 x 25 cm, 10 μ m) aufgetragen und mit einem steigenden Acetonitrilgradienten eluiert. Fraktionen, die Reinprodukt enthielten, wurden
5 vereinigt und lyophilisiert.

- 30 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (C) INDIVIDUUM ISOLAT: synthetisch

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTGAAGGAAG CCGACCAGAG TACG

24

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (C) INDIVIDUUM ISOLAT: synthetisch

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CTGGAGACTG CCATGGCCCA CAAGTGCGAT ATCACC

36

- 29 -

CATGCACAAG TGCGAT

16

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (C) INDIVIDUUM ISOLAT: synthetisch

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATCGCACTTG TG

12

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (C) INDIVIDUUM ISOLAT: synthetisch

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCCTCCAAGG ACACAACTGA G

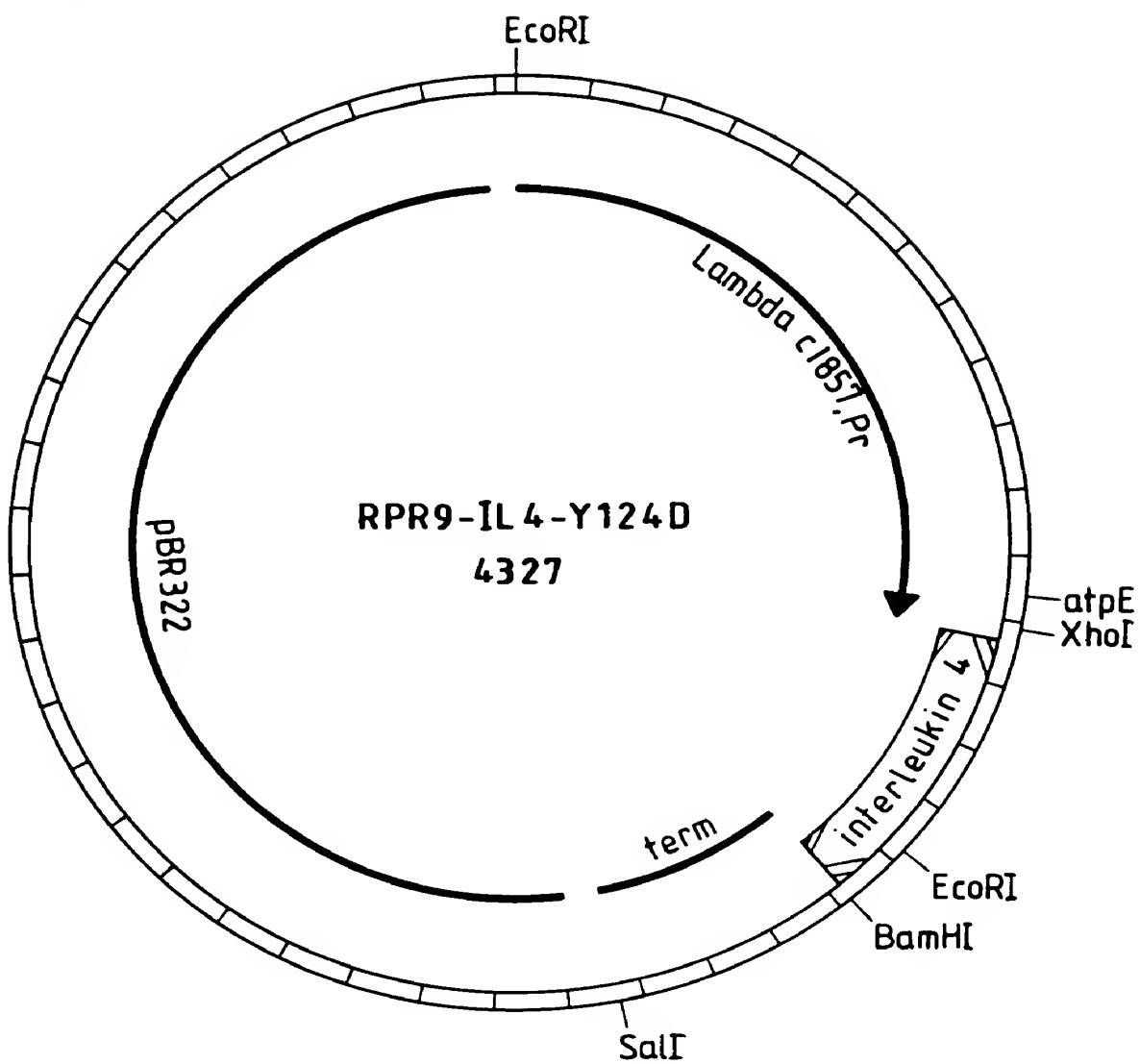
21

Patentansprüche

1. Humane Interleukin-4-Mutantenproteine als Antagonisten oder partielle Agonisten des humanen Interleukin 4, dadurch gekennzeichnet, daß neben Austauschen in den Positionen 121, 124 oder 125 zusätzliche Modifikationen am N- und/oder C-Terminus vorhanden sind, und/oder daß potentielle Glycosylierungsstellen im Molekül deletiert sind und/oder daß das Mutantenprotein mit einem Nicht-Protein-Polymer gekoppelt ist.
5
2. Arzneimittel, die Substanzen nach Anspruch 1 enthalten.

"1 / 1"

Fig. 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Final Application No
PCT/EP 95/02358

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, vol. 373, no. 9, September 1992 pages 789-790, N. KRUSE ET AL 'Mutational analysis of human interleukin-4: identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist' see abstract</p> <p>----</p>	1,2
Y	<p>EMBO JOURNAL, vol. 11, no. 9, September 1992 EYNSHAM, OXFORD GB, pages 3237-3244, N. KRUSE ET AL 'Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement' see the whole document</p> <p>-----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/02358A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/54 A61K38/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 10235 (SEBALD, WALTER) 27 May 1993 cited in the application see the whole document ----	1,2
Y	WO,A,88 04667 (IMMUNEX CORPORATION) 30 June 1988 see page 9, line 5 - page 11, line 22 ----	1,2
Y	US,A,5 298 410 (C.P. PHILLIPS ET AL) 29 March 1994 see column 3, line 58 - column 4, line 32; example 12 ---- -/-	1,2

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search 31 October 1995	Date of mailing of the international search report 29.11.95
--	--

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/02358

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9310235	27-05-93	DE-A-	4137333	19-05-93
		AU-A-	2928292	15-06-93
		CA-A-	2123315	27-05-93
		CZ-A-	9401185	15-12-94
		EP-A-	0613499	07-09-94
		HU-A-	66826	30-01-95
		JP-T-	7501522	16-02-95
		NO-A-	941681	06-05-94
<hr/>				
WO-A-8804667	30-06-88	AU-B-	620537	20-02-92
		AU-B-	1055988	15-07-88
		EP-A-	0335900	11-10-89
		JP-T-	2501827	21-06-90
<hr/>				
US-A-5298410	29-03-94	AU-B-	660843	06-07-95
		AU-B-	4616293	01-09-94
		CA-A-	2106519	26-08-94
		CZ-A-	9400381	19-10-94
		EP-A-	0614666	14-09-94
		FI-A-	940909	26-08-94
		JP-A-	6256222	13-09-94
		NO-A-	940663	26-08-94
		NZ-A-	248590	26-07-95
		US-A-	5389381	14-02-95
		US-A-	5334382	02-08-94
<hr/>				

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, Bd. 373, Nr. 9, September 1992 Seiten 789-790, N. KRUSE ET AL 'Mutational analysis of human interleukin-4: identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist' siehe Zusammenfassung ---	1,2
Y	EMBO JOURNAL, Bd. 11, Nr. 9, September 1992 EYNSHAM, OXFORD GB, Seiten 3237-3244, N. KRUSE ET AL 'Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement' siehe das ganze Dokument -----	1,2

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 95/02358A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/54 A61K38/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,93 10235 (SEBALD, WALTER) 27.Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2
Y	WO,A,88 04667 (IMMUNEX CORPORATION) 30.Juni 1988 siehe Seite 9, Zeile 5 - Seite 11, Zeile 22 ---	1,2
Y	US,A,5 298 410 (C.P. PHILLIPS ET AL) 29.März 1994 siehe Spalte 3, Zeile 58 - Spalte 4, Zeile 32; Beispiel 12 ---	1,2

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31.Okttober 1995

29.11.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Le Cornec, N

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02358

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9310235	27-05-93	DE-A-	4137333	19-05-93
		AU-A-	2928292	15-06-93
		CA-A-	2123315	27-05-93
		CZ-A-	9401185	15-12-94
		EP-A-	0613499	07-09-94
		HU-A-	66826	30-01-95
		JP-T-	7501522	16-02-95
		NO-A-	941681	06-05-94
<hr/>				
WO-A-8804667	30-06-88	AU-B-	620537	20-02-92
		AU-B-	1055988	15-07-88
		EP-A-	0335900	11-10-89
		JP-T-	2501827	21-06-90
<hr/>				
US-A-5298410	29-03-94	AU-B-	660843	06-07-95
		AU-B-	4616293	01-09-94
		CA-A-	2106519	26-08-94
		CZ-A-	9400381	19-10-94
		EP-A-	0614666	14-09-94
		FI-A-	940909	26-08-94
		JP-A-	6256222	13-09-94
		NO-A-	940663	26-08-94
		NZ-A-	248590	26-07-95
		US-A-	5389381	14-02-95
		US-A-	5334382	02-08-94
<hr/>				

**TRANSLATION
PATENT COOPERATION TREATY**

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference LeA30218PCBu	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 95/02358	International filing date (day/month/year) 19.06.1995	Priority date (day/month/year) 01.07.1994
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K14/54		
Applicant BAYER AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application 	

Date of submission of the demand 05.10.1995	Date of completion of this report 07.06.1996
Name and mailing address of the IPEA/ EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*:

the international application as originally filed.

the description. pages _____ as originally filed.
pages _____ filed with the demand.
pages _____ filed with the letter of _____
pages _____ filed with the letter of _____

the claims. Nos. _____ as originally filed.
Nos. _____ as amended under Article 19.
Nos. _____ filed with the demand.
Nos. _____ filed with the letter of _____
Nos. _____ filed with the letter of _____

the drawings. sheets/fig _____ as originally filed.
sheets/fig _____ filed with the demand.
sheets/fig _____ filed with the letter of _____
sheets/fig _____ filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description. pages _____

the claims. Nos. _____

the drawings. sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 95/02358

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 2 in part	YES
	Claims	1, 2 in part	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1, 2	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 2	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The following search report citations are considered in this international preliminary examination report:

D1 to D5;

the same numbering will also be used in the same sequence in the subsequent proceedings.

2. The present application does not satisfy the criterion of PCT Article 33(2) since the subjects of claims 1 and 2 are not novel in the light of the prior art as defined in the Regulations (PCT Rule 64.1 to 64.3).

D1 (claims 2 to 5) claims therapeutic agents which are antagonists or partial agonists of hIL-4 or contain the latter, are hIL-4-mutant proteins and, in addition to the amino acid replacements in positions 121, 124 and/or 125, have the ability to break off the polypeptide chain, so satisfying the claimed criterion for modification at the C-terminal end of the polypeptide chain.

3. The present application does not satisfy the criterion of PCT Article 33(3) since the subjects of claims 1 and 2 do not involve an inventive step (PCT Rule 65.1, 65.2).

The technical problem addressed by the present application is to provide novel human interleukin-4-mutant proteins which are effective as antagonists or partial agonists of human interleukin-4 (hIL4), and additionally have greater stability and can be purified more easily.

The above technical problem is solved in that, in addition to replacing amino acids 121, 124 or 125 in the hIL-4 chain, additional modifications occur at the N and/or C-terminal, and/or potential glycosylation sites are deleted and/or the mutant protein is coupled to a non-protein polymer.

D1, the closest prior art, discloses hIL-4-mutant proteins which were each subjected to amino acid replacement in positions 121, 124 and 125 of the polypeptide chain. Antagonistic or partially agonistic effects of the mutants towards hIL-4 could thus be attained (cf. examples 1 to 3 of D1). The mutants described are used as medicaments.

D2 describes the importance of the inactivation of N-glycosylation sites in the hIL-4 molecule in order to overcome problems such as low yields in isolation and purification or the immunogenic effects of molecules containing sugar residues. Success is achieved here with the replacement in the hIL-4

molecule of amino acids which can potentially be used for glycosylation with amino acids which are structurally unsuitable for that purpose and thus alter the detection sequence **Asn-A¹-Z** (**A¹** can be any amino acid; **Z** = **Ser**, **Thr**) for glycosylating enzymes such that *in vivo* glycosylation is no longer possible (cf. page 9, line 5 to page 12, line 2 and the claims).

D5 describes the conversion of hIL-4 into a high-affinity antagonist (IL-4 variant **Y124D**) by replacing **Tyr124** with **Asp**. The substitution of **Tyr124** by **Phe**, **His**, **Asn** or **Gly** leads to partial agonists with uninfluenced receptor-bonding affinity. The significance of the C or N-terminal for the spatial arrangement in the IL-4 molecule and thus for the biological activity (as antagonist or agonist) is mentioned on page 3241 (right-hand column, lines 20 to 43).

D3 describes the covalent bonding of non-protein polymers (polyethylene glycol) to recombinant hIL-4 for increasing the half-life value (cf. column 3, line 58 to column 4, line 32 and example 12).

Like D1, D4 discloses hIL-4 mutations which, owing to amino acid replacement in positions **Arg121**, **Tyr125** and **Ser125**, lead to antagonists or partial agonists of hIL-4.

The combination of the technical features of D1 and D2 to D5 is an obvious approach for a person skilled in the art wishing to solve the technical problem.

Replacing amino acids in positions 121, 124 and 125 leads to mutants having antagonistic or partially agonistic activity towards hIL-4. With the teaching of D5 concerning the importance of the C or N-terminal for the spatial structure, a person skilled in the art occupied with solving the technical problem will be prompted to modify the C/N-terminal ends of the mutated hIL-4 peptide chain. The same applies to the deletion of the glycoside-bonding sites (cf. D2). The conjugation of non-protein polymers in order to increase the stability of rhIL-4 is explicitly disclosed in D3 and is anticipated as a way of solving the problem of stability.

The present application does not indicate that the hIL-4 muteins have antagonistic or partially agonistic properties which, as an unforeseeable effect, would imply inventive activity.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The application does not satisfy the requirements of PCT Article 6 since claim 1 is unclear. "Positions 121, 124 and 125" in claim 1 are not clearly defined as positions in the peptide chain or amino acid sequence of the HIL-4 muteins. The term "additional modifications" in claim 1 likewise contravenes the requirements of PCT Article 6 since it does not allow any conclusions to be drawn about the type of modification (however, see page 6, lines 28 to 30 of the application which shows the possible modifications as **deletions, insertions or substitutions**).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte

Application No

PCT/EP 95/02358

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C07K14/54 A61K38/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 10235 (SEBALD, WALTER) 27 May 1993 cited in the application see the whole document ---	1,2
Y	WO,A,88 04667 (IMMUNEX CORPORATION) 30 June 1988 see page 9, line 5 - page 11, line 22 ---	1,2
Y	US,A,5 298 410 (C.P. PHILLIPS ET AL) 29 March 1994 see column 3, line 58 - column 4, line 32; example 12 --- -/-	1,2

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 October 1995

Date of mailing of the international search report

29.11.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

23
T

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 11 JUN. 1996

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts LeA30218PCBu	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/02358	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 19/06/1995	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/07/1994
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/54		
Anmelder BAYER AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfasst insgesamt sieben Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geänderte wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I Grundlage des Berichts
- II Priorität
- III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 05/10/1995	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 07.06.96
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter RP. Döpfer Tel. 8547 K.-P. Döpfer

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP95/02358

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

[x] der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

[] der Beschreibung, Seite/n _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung: Seite _____.

[] Ansprüche: Nr. _____.

[] Zeichnungen: Blatt/Abb. _____

3. [] Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung

1. FESTSTELLUNG

Neuheit	Ansprüche 1, 2 teilweise Ja _____ JA
	Ansprüche 1, 2 teilweise Nein _____ NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche _____ JA
	Ansprüche 1, 2 Nein _____ NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche 1, 2 Ja _____ JA
	Ansprüche _____ NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

1. Die folgenden im Recherchenbericht zitierten Dokumente werden in diesem Internationalen Vorläufigen Prüfungsbericht angegeben (D1 - D5); die Numerierung wird entsprechend der Reihenfolge im Recherchenbericht auch im weiteren Verfahren beibehalten.
2. Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 1 und 2 im Hinblick auf den in der Ausführungsordnung umschriebenen Stand der Technik (Regel 64.1 - 64.3 PCT) nicht neu ist.
In D1 (Ansprüche 2-5) werden therapeutische Mittel beansprucht, die Antagonisten oder partielle Agonisten des hIL-4 sind oder diese enthalten und hIL-4-Mutantenproteine sind und neben den Aminosäureaustauschen an den Positionen 121, 124 und/oder 125 die Möglichkeit des Abbruches der Polypeptidkette beinhalten und damit dem beanspruchten Kriterium der Modifikation am C-terminalen

Ende der Polypeptidkette genügen.

3. Die vorliegende Anmeldung erfüllt das, in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 1 und 2 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht (Regel 65.1, 65.2 PCT).

Die der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende technische Aufgabe ist dahingehend definiert, neue humane Interleukin-4-Mutantenproteine zur Verfügung zu stellen, die als Antagonisten bzw. partielle Agonisten des huma-
nen Interleukin-4 (hIL-4) wirksam sind, und zusätzlich über eine größere Stabilität verfügen, bzw. leichter zu reinigen sind.

Die o.g. technische Aufgabe wurde dadurch gelöst, dass neben Austauschen der Aminosäuren 121, 124 oder 125 in der Kette des hIL-4 zusätzliche Modifikationen am N- und/oder C-Terminus vorgenommen wurden, und/oder poten-
tielle Glykosylierungsstellen deletiert sind und/oder daß das Mutantenprotein mit einem Nicht-Protein-Polymer gekoppelt ist.

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart hIL-4-Mutantenproteine, die jeweils an den Positionen 121, 124 bzw. 125 der Polypeptidkette Aminosäureaustauschen unterworfen wurden. Dabei konnten antagonistische bzw. partiell agonistische Wir-
kungen der Muteine gegenüber hIL-4 erzielt werden (s. Beispiele 1-3 in D1). Die beschriebenen Muteine finden Verwendung als Arzneimittel.

D2 beschreibt die Wichtigkeit der Inaktivierung von N-Glykosylierungsstellen im hIL-4-Molekül, um Problemen, wie niedrigen Ausbeuten bei der Isolierung und Reinigung

oder immunogener Wirkungen von Zuckerresten enthaltenden Molekülen, aus dem Wege zu gehen. Als erfolgreich in diesem Sinne erweist sich der Austausch von Aminosäuren im hIL-4-Molekül, die potentiell für eine Glykosylierung in Frage kommen, gegen solche, die dafür aus strukturellen Gründen nicht in Frage kommen und damit die Erkennungssequenz Asn-A¹-Z (A¹ kann jede Aminosäure sein; Z = Ser, Thr) für glykosylierende Enzyme dergestalt verändern, daß eine in-vivo-Glykosylierung nicht mehr erfolgt (siehe Seite 9, Zeile 5 bis Seite 12, Zeile 2, Ansprüche).

In D5 wird die Umwandlung von hIL-4 in einen hochaffinen Antagonisten (IL-4-Variante Y124D) durch Ersatz von Tyr124 durch Asp beschrieben. Die Substitution von Tyr124 durch Phe, His, Asn oder Gly führt zu partiellen Agonisten mit unbeeinflusster Rezeptorbindungsaffinität. Die Bedeutung des C- bzw. N-Terminus für die räumliche Anordnung im IL-4-Molekül und damit für die biologische Aktivität (als Antagonist oder als Agonist) ist auf Seite 3241 (rechte Spalte, Zeilen 20 bis 43) erwähnt.

In D3 wird die kovalente Bindung von Nichtprotein-Polymeren (Polyethylenglykol) an rekombinantes hIL-4 zur Erhöhung der Halbwertszeit offenbart (siehe Spalte 3, Zeile 58 bis Spalte 4, Zeile 32, Beispiel 12).

D4 offenbart in Analogie zu D1 Mutationen an hIL-4, die durch Aminosäureaustausch an den Positionen Arg121, Tyr124 bzw. Ser125 zur Antagonisten bzw. partiellen Agonisten des hIL-4 führen.

Die Kombination der technischen Merkmale aus D1 und den Dokumenten D2 bzw. D5 stellt eine für den Fachmann übliche Vorgehensweise dar, um die technische Aufgabe zu lösen. Der Ersatz von Aminosäuren an den Positionen 121,

124 bzw. 125 führt zu Mutanten mit antagonistischer bzw. partiell agonistischer Aktivität gegen hIL-4. Mit der Lehre aus D5 über die Wichtigkeit des C- bzw. N-Terminus für die räumliche Struktur wird der mit der Lösung der Aufgabe befaßte Fachmann zur Modifikation der C/N-terminalen Enden der Peptidkette des mutierten hIL-4 geführt. Desgleichen gilt für die Deletion der Glykosid-Bindungsstellen (vgl. D2). Die Konjugation von Nicht-protein-Polymeren zur Erhöhung der Stabilität von rhIL-4 ist in D3 explizit offenbart und wird im Sinne der Lösung des Stabilitätsproblems vorweggenommen.

Es ist aus der vorliegenden Anmeldung nicht erkennbar, daß die hIL-4-Mutante eine antagonistische bzw. partiell agonistische Eigenschaften aufweisen, die im Sinne eines nicht vorhersehbaren Effekts erfinderische Tätigkeit implizieren würden.

4. Die Anmeldung erfüllt die Erfordernisse des Artikels 6 PCT nicht, weil der Anspruch 1 nicht klar ist. Die "Positionen 121, 124 und 125" im Anspruch 1 sind nicht eindeutig als Positionen in der Peptidkette bzw. Aminosäuresequenz der hIL-4-Mutante definiert. Der Begriff "zusätzliche Modifikationen" in Anspruch 1 steht ebenfalls im Widerspruch zu den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, da er keinerlei Rückschlüsse auf die Art der Modifikation gestattet (siehe aber Seite 6, Zeilen 28-30 der Anmeldung, die die möglichen Modifikationen als Deletion, Insertion bzw. Substitution ausweist).

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

VIII. Bestimzte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

Siehe die Anmerkungen unter Punkt V.2.4

PCT**ANTRAG**

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Antragant auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmelde datum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) Le A 30 218-PC Bu**Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG**Neue hIL-4-Mutantenproteine als Antagonisten oder partielle
Agonisten des humanen Interleukin 4**Feld Nr. II ANMELDER**Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung.
Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)BAYER AKTIENGESELLSCHAFT
51368 Leverkusen, DE Diese Person ist
gleichzeitig ErfinderTelefonnr.:
0214 30 71166Telefaxnr.:
0214 30 34 82Fernschreibnr.:
85 101-265bydStaatsangehörigkeit (Staat):
DESitz oder Wohnsitz (Staat):
DEDiese Person ist Anmelder für folgende Staaten: alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten**Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER**Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung.
Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)Wild, Hanno
397 Longmeadow Road, Orange,
Connecticut 06477
US
Am Wolfshahn 19
D 42111 Wuppertal, GE

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)Staatsangehörigkeit (Staat):
DESitz oder Wohnsitz (Staat):
USDiese Person ist Anmelder für folgende Staaten: alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.**Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT**

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln:

 Anwalt gemeinsamer
Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT
51368 Leverkusen, DE

Telefonnr.:

0214 30 71166

Telefaxnr.:

0214 30 34 82

Fernschreibnr.:

85 101-265byd

 Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben)		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Hanko, Rudolf Schillerstraße 23 D 40237 Düsseldorf DE			
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika		<input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben)		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Dörschug, Michael Buchenstraße 5 D 42579 Heiligenhaus DE			
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika		<input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben)		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Hörlein, Hans-Dietrich Paul-Ehrlich-Straße 20 D 42 113 Wuppertal DE			
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika		<input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben)		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Beunink, Jürgen Spitzwegstraße 29 D 42329 Wuppertal DE			
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika		<input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.			

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)
Apeler, Heiner Claudiusweg 3 D 42 115 Wuppertal DE	✓

Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:	<input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)
Wehlmann, Hermann Mastweg 3a D 42349 Wuppertal DE	✓

Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:	<input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)
Sebald, Walter Meyer-Olbersleben: Straße 7 D 97074 Würzburg DE	✓

Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:	<input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:	<input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.	

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

AP ARIPO-Patent: KE Kenia, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist

EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist

OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

<input type="checkbox"/> AM Armenien	<input type="checkbox"/> MD Republik Moldau
<input type="checkbox"/> AT Österreich	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australien	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien	<input type="checkbox"/> MX Mexiko
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien	<input type="checkbox"/> NL Niederlande
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen
<input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada	<input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland
<input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> PL Polen
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input type="checkbox"/> PT Portugal
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik	<input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien
<input type="checkbox"/> DE Deutschland	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation
<input type="checkbox"/> DK Dänemark	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input type="checkbox"/> EE Estland	<input type="checkbox"/> SE Schweden
<input type="checkbox"/> ES Spanien	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei
<input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich	<input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan
<input type="checkbox"/> GE Georgien	<input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago
<input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika
<input type="checkbox"/> KE Kenia	<input type="checkbox"/> UZ Usbekistan
<input type="checkbox"/> KG Kirgisistan	<input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam
<input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea	
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea	
<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan	
<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka	
<input type="checkbox"/> LR Liberia	
<input type="checkbox"/> LT Litauen	
<input type="checkbox"/> LU Luxemburg	
<input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland	

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

<input type="checkbox"/>

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld nicht benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Dieses Feld ist in folgenden Fällen auszufüllen:

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht:

insbesondere:

i) Wenn mehr als drei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein Fortsetzungsbilanz zur Verfügung steht:

ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist:

iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist:

iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwälten Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind:

v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent", "Zusatzzertifikat" oder "Zusatzzertifikatschein" oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird:

vi) Wenn die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. ..." [Nummer des Feldes angeben] die gleichen Angaben zu machen wie in dem Feld vorgesehen, das platzmäßig nicht ausreicht;

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. III" für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgesehenen Angaben zu machen.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" oder "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" die Namen der Anmelder und neben jedem Namen der Staat oder die Staaten (und/oder ggf. Europäisches oder OAPI-Patent) anzugeben, für die die bezeichnete Person Anmelder ist.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. II" oder "Fortsetzung von Feld Nr. III" oder "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" der Name des Erfinders und neben jedem Namen der Staat oder die Staaten (und/oder ggf. Europäisches oder OAPI-Patent) anzugeben, für die die bezeichnete Person Erfinder ist.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. IV" für jeden weiteren Anwalt die gleichen Angaben zu machen wie in Feld Nr. IV vorgesehen.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. V" die Namen der betreffenden Staaten (oder OAPI) und nach dem Namen jeder dieser Staaten (oder OAPI) das Aktenzeichen des Haupenschutzrechts oder der Haupenschutzrechthonmeldung und das Datum der Erteilung des Haupenschutzrechts oder der Einreichung der Haupenschutzrechtsanmeldung anzugeben.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. VI" für jede weitere frühere Anmeldung die gleichen Angaben zu machen wie in Feld Nr. VI vorgesehen.

In diesem Fall ist mit dem Vermerk "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" nachstehend diese Erklärung abzugeben.

2. Wenn der Anmelder für irgendein Bestimmungsmäß die Vergünstigung notionaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt:

Weitere Unterschriften zu Feld IX.

1) Hanno Wild
Hanno Wild

2) Rudolf Hanko
Rudolf Hanko

3) Michael Dörschug
Michael Dörschug

4) Hans Dietrich Hörlein
Hans Dietrich Hörlein

5) Jürgen Beunink
Jürgen Beunink

6) Heiner Apeler
Heiner Apeler

7) Heimann Wehlmann
Heimann Wehlmann

8) Walter Sebald
Walter Sebald

Feld Nr. VI PRIORITYANSPRUCH

Weitere Prioritätsansprüche im Zusatzfeld angegeben.

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Aumelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) DE	(01.07.1994) 01. Juli 1994	P 44 23 131.8	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt): Datum (Tag/Monat/Jahr): Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfaßt:		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
1. Antrag	: 6 Blätter	1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte 5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
2. Beschreibung	: 3,0 Blätter	2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen 6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinter- Vollmacht legten Mikroorganismen
3. Ansprüche	: 1 Blätter	3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen 7. <input checked="" type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide der Unterschrift und/or Aminosäuren (Diskette)
4. Zusammenfassung:	: 1 Blätter	4. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch 8. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzelnen aufführen): die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen): Druckschriftenbestellung Abbuchungsauftrag
5. Zeichnungen	: Blätter	
Insgesamt	: 3 9 Blätter	

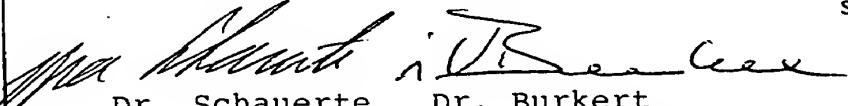
Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

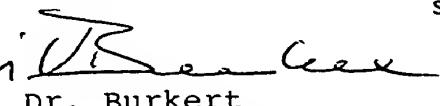
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist nebener Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

Weitere Unterschriften
s. Blatt 5.


Dr. Schauerte


Dr. Burkert

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde:	ISA /
6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben	

2. Zeichnungen
einge-
gangen:

nicht ein-
gegangen:

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars
beim Internationalen Büro:

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
IM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts LeA30218PCBu	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/ 02358	Internationales Anmeldedatum (<i>Tag/Monat/Jahr</i>) 19/06/95	(Frühestes) Prioritätsdatum (<i>Tag/Monat/Jahr</i>) 01/07/94
Anmelder		
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfasst insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. wie vom Anmelder vorgeschlagen keine der Abb.

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02358

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/54 A61K38/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,93 10235 (SEBALD, WALTER) 27.Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2
Y	WO,A,88 04667 (IMMUNEX CORPORATION) 30.Juni 1988 siehe Seite 9, Zeile 5 - Seite 11, Zeile 22 ---	1,2
Y	US,A,5 298 410 (C.P. PHILLIPS ET AL) 29.März 1994 siehe Spalte 3, Zeile 58 - Spalte 4, Zeile 32; Beispiel 12 ---	1,2

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 31.Okttober 1995	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 29.11.95
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Le Corne, N

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

/EP 95/02358

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, Bd. 373, Nr. 9, September 1992 Seiten 789-790, N. KRUSE ET AL 'Mutational analysis of human interleukin-4: identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist' siehe Zusammenfassung ---	1,2
Y	EMBO JOURNAL, Bd. 11, Nr. 9, September 1992 EYNSHAM, OXFORD GB, Seiten 3237-3244, N. KRUSE ET AL 'Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement' siehe das ganze Dokument -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 95/02358

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9310235	27-05-93	DE-A-	4137333	19-05-93
		AU-A-	2928292	15-06-93
		CA-A-	2123315	27-05-93
		CZ-A-	9401185	15-12-94
		EP-A-	0613499	07-09-94
		HU-A-	66826	30-01-95
		JP-T-	7501522	16-02-95
		NO-A-	941681	06-05-94
<hr/>				
WO-A-8804667	30-06-88	AU-B-	620537	20-02-92
		AU-B-	1055988	15-07-88
		EP-A-	0335900	11-10-89
		JP-T-	2501827	21-06-90
<hr/>				
US-A-5298410	29-03-94	AU-B-	660843	06-07-95
		AU-B-	4616293	01-09-94
		CA-A-	2106519	26-08-94
		CZ-A-	9400381	19-10-94
		EP-A-	0614666	14-09-94
		FI-A-	940909	26-08-94
		JP-A-	6256222	13-09-94
		NO-A-	940663	26-08-94
		NZ-A-	248590	26-07-95
		US-A-	5389381	14-02-95
		US-A-	5334382	02-08-94
<hr/>				

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Washington D.C. 20231
United States of America

Date of mailing:

18 January 1996 (18.01.96)

in its capacity as elected Office

International application No.:

PCT/EP95/02358

Applicant's or agent's file reference:

Le A 30 218-PC Bu

International filing date:

19 June 1995 (19.06.95)

Priority date:

01 July 1994 (01.07.94)

Applicant:

WILD, Hanno et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

05 October 1995 (05.10.95)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra
Telephone No.: (41-22) 730.91.11

PATENT COOPERATION TREATY

1801

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
14 February 1997 (14.02.97)

International application No.
PCT/EP95/02358

International filing date (day/month/year)
19 June 1995 (19.06.95)

Applicant

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT et al

RECEIVED
JUN 05 1997
GROUP 1200

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

S. Mafia

Telephone No.: (41-22) 730.91.11